

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.15206

## 石油暴露对栉孔扇贝免疫酶活性及血细胞稳定性的影响

任加云<sup>1</sup>, 苗晶晶<sup>2</sup>, 李学平<sup>1</sup>

1. 滨州学院 资源环境系, 山东 滨州 256600;
2. 中国海洋大学 水产养殖系, 山东 青岛 266003

**摘要:** 实验室条件下设置海水石油烃质量浓度分别为 0.05 mg/L, 0.30 mg/L, 0.50 mg/L 和 1.00 mg/L, 以栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 为实验对象, 实验时间为 30 d, 分别在 0, 0.5 d, 3 d, 6 d, 10 d, 15 d, 21 d 和 30 d 取样, 测定其消化盲囊、鳃丝和血淋巴部分免疫酶活性和细胞稳定性指标。结果显示, 低浓度 0.05 mg/L 处理组, 各指标变化不显著 ( $P>0.05$ ), 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组中, 消化盲囊和鳃丝的碱性磷酸酶 (ALP)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活力在实验期间显著升高 ( $P<0.05$ ); 在高浓度 1.00 mg/L 处理组, 消化盲囊和鳃丝的 ALP、SOD 和 GPx 活力在实验中后期接近或者低于对照组的水平, 其中鳃丝各指标变化较为明显; 0.05 mg/L 处理组血细胞膜稳定性未受影响 ( $P>0.05$ ), 而其余各浓度组在实验中后期都明显低于对照组水平 ( $P<0.05$ ), 浓度越高, 细胞膜稳定性降低速度越快。结果表明, 0.05 mg/L 低浓度石油烃污染在整个实验时间内并未对栉孔扇贝造成伤害, 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 浓度石油烃短期对其造成的影响较小, 但随着实验时间的延长, 血细胞膜稳定性显著降低 ( $P<0.05$ ), 机体受到一定程度的损伤; 1.00 mg/L 浓度石油烃对栉孔扇贝的影响非常明显, 3 d 内便造成了鳃丝的氧化损伤和血细胞膜稳定性的大幅度降低; 相同浓度石油烃暴露下, 鳃丝抗氧化酶和 ALP 的变化较消化盲囊明显, 对石油烃反应更敏感; 实验中各项指标的变化呈现剂量效应和时间效应关系, 可以尝试用作评价海洋石油烃污染程度的生物监测指标。

**关键词:** 石油烃; 栉孔扇贝; 抗氧化酶; 碱性磷酸酶; 细胞膜稳定性

中图分类号: X171

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)06-1219-08

随着海上运输的不断发展和突发性石油泄漏事件的增多, 海洋局部区域石油污染不断加剧, 石油中所含的轻芳香烃物质及其衍生物在海洋生物体内不断蓄积, 对其生长和生存造成了较大的影响<sup>[1-2]</sup>, 前期有学者已针对重金属和有机污染物包括石油对某些水生生物的影响效应做了研究, 结果表明, 水生生物体内部分指标如抗氧化酶、磷酸酶和生物转化酶在污染物的影响下具有明显的变化特点<sup>[3-7]</sup>, 这些指标可作为环境胁迫的预警指标, 对监测和评估某些污染物的影响具有重要意义<sup>[8-9]</sup>。

双壳贝类是很好的研究免疫毒理学的受试生

物, 有较多的研究发现其在污染物影响下抗氧化酶、生物转化酶和其他免疫酶等活力会明显升高或降低<sup>[10-11]</sup>, 其中栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 在中国沿海养殖中非常普遍, 由于其代谢率较低, 对石油烃等污染物具有较强的富集作用, 之前已被成功的作为实验对象来研究污染物对生物的致毒效应<sup>[12-13]</sup>。但是截止目前, 针对石油烃对栉孔扇贝各指标影响的相关研究实验设置时间较短 (一般在 15 d 内), 浓度设置梯度和取样次数有限, 且将抗氧化酶、磷酸酶和细胞膜稳定性结合起来的研究较少, 不能全面反映石油烃影响下栉孔扇贝解毒机理和受损伤的特征。本实验通过研究不

收稿日期: 2015-05-14; 修订日期: 2015-06-02.

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目 (ZR2014CQ048).

作者简介: 任加云 (1980-), 男, 硕士, 讲师, 主要从事水产养殖毒理学的研究. E-mail: renjiayun@163.com

同浓度石油烃在 30 d 内对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性以及血细胞膜稳定性的影响,探讨这些指标的变化情况和相互联系,以揭示栉孔扇贝对石油烃污染胁迫的免疫应答规律,以及各浓度石油烃对栉孔扇贝的影响特点,为贝类毒理学的研究提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用栉孔扇贝壳高(5.1±0.4) cm,购自青岛沙子口贝类养殖基地,实验开始前选取大小均一,健康的个体,用盐度为 30、pH 为 7.8 的海水暂养 14 d,养殖水温控制在 12~13℃,充氧泵不间断供氧,日换水 1/3,每日投喂螺旋藻粉 2 次,平均每次投饵量为 5.0 mg/L 养殖海水。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 主要实验仪器及试剂** F-4600 荧光光谱仪(日本日立); Allegra 64R 高速冷冻离心机(美国贝克曼); AU-1901 紫外可见分光光度计(北京普析); SHA-C 恒温水浴振荡器(常州澳华); 谷胱甘肽(美国 Sigma); 对硝基酚磷酸二钠(美国 Sigma); 2-硝基苯甲酸(美国 Sigma); 石油醚、盐酸、硫酸、氢氧化钠、乙二胺四乙酸二钠、邻苯三酚和中性红等药品均为国产 AR 级。

**1.2.2 石油烃制备与实验梯度的设置** 实验原油取自胜利油田滨南采油厂,按原油与实验养殖海水 1:9(v/v)混合于锥形瓶中,磁力搅拌器搅拌 24 h,静置分层 6 h 后,取底层溶液于棕色玻璃瓶中于 4℃冷藏保存备用,将其作为石油烃母液。依据国家海水水质标准 GB 3097—1997<sup>[14]</sup>中规定的石油烃浓度(一类、二类海水中石油类浓度 0.05 mg/L,三类海水中石油类浓度 0.30 mg/L,四类海水中石油类浓度 0.50 mg/L),并结合滨州无棣渤海近岸海水中石油烃的浓度分布情况(课题组取样测定其平均浓度为 0.024 mg/L),将实验浓度梯度设置为水质标准各类海水规定的浓度即

0.05 mg/L, 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L,再加上一个高浓度 1.00 mg/L 处理组,以不加入石油烃的空白海水作为对照组(经测定空白海水本底石油烃含量为 0.011 mg/L)。在规格为 60 cm×45 cm×35 cm 的水槽中,分别加入一定体积的石油烃母液,并用暂养海水稀释到实验所需的浓度梯度,所有槽中海水石油烃的浓度利用采用 GB 17378.4—2007<sup>[15]</sup>中所规定的荧光分光光度法来测定,经测定本实验所用的石油烃母液浓度为 865.4 mg/L,实验进行后每 3 天测定各处理梯度石油烃实际浓度平均为(0.06±0.008) mg/L、(0.31±0.050) mg/L、(0.48±0.089) mg/L 和(1.12±0.101) mg/L,所有实验梯度均设 3 个平行组。

各实验梯度分别取大小均匀的健康栉孔扇贝各 40 只,实验期间的养殖管理与暂养期间完全相同,换水时各实验梯度分别加入相同浓度石油烃的养殖海水。实验于石油烃加入后 0、0.5 d、1 d、3 d、6 d、10 d、15 d、21 d、30 d 取样,取样组织为消化盲囊和鳃丝,用预冷重蒸水洗净、滤纸吸干,并用针管从扇贝闭壳肌处抽取血液,所有样品置于 1.5 mL 离心管中,并迅速于-80℃保存,取样后 24 h 内迅速测定相应指标。

**1.2.3 样品制备** 测定前将消化盲囊或鳃丝在冰浴中匀浆 5 min,转速为 12000 r/min,取匀浆液在温度为 4℃转速为 10000 r/min 离心 25 min 后,取上清液作为酶液来测定碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)的活力,血液解冻后测定细胞膜稳定性。

**1.2.4 各种指标和蛋白浓度的测定方法** ALP 酶活性的测定使用 Principato 等<sup>[16]</sup>的方法进行,以每分钟每毫克蛋白产生的对硝基苯酚的量来表示,单位为 nmol/(mg·min); SOD 活力的测定参照 Marklund 等<sup>[17]</sup>的方法,活力单位定义为 25℃条件下,每 min 抑制邻苯三酚自氧化率达 50%时所需要的酶量,单位为 U/(mg·min); GPx 活力的测定用改良的 DTNB 比色法<sup>[18]</sup>,单位用 nmol/(mg·min)表示;血细胞膜稳定性用 Babich 等<sup>[19]</sup>的中性红染

色法测定, 单位为 U/mg; 蛋白含量用 Bradford 的方法<sup>[20]</sup>测定。

### 1.3 数据的处理和分析

本实验数据利用 SPSS 19.0 软件来进行, 首先采用双因素 Two-way ANOVA 方差分析法对不同浓度石油烃以及不同作用时间对各指标的影响进行处理分析, 然后分别采用单因素 One-way ANOVA 方差分析和 Duncan 均值多重比较检验法进行处理分析, 以 3 个重复组数据的平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 表示, 当  $P < 0.05$  时, 认为差异明显, 否则认为差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 各浓度石油烃对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 ALP 活性的影响

图 1 显示, 0.05 mg/L 消化盲囊 ALP 活力在整个时间内与对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组消化盲囊 ALP 活力分别从第 3 天和第 0.5 天开始显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 两个浓度组消化盲囊 ALP 活力自 3 d 后趋于稳定, 石油烃和 ALP 活力之间存在剂量效应关系, 1.00 mg/L 处理组中消化盲囊 ALP 活力在 0.5 d 左右明显被激活 ( $P < 0.05$ ), 随后下降, 在 1 d 之后显著被抑制 ( $P < 0.05$ ); 图 2 显示 0.05 mg/L 处理组鳃丝 ALP 活力与对照组相比变化不明显 ( $P > 0.05$ ), 而 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组石

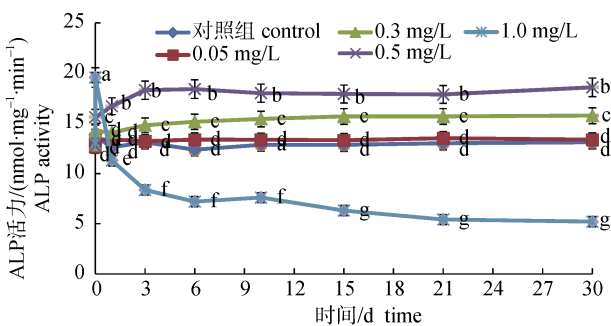


图 1 石油烃对栉孔扇贝消化盲囊 ALP 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 Effects of petroleum hydrocarbon on ALP activities of digestive gland  
Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

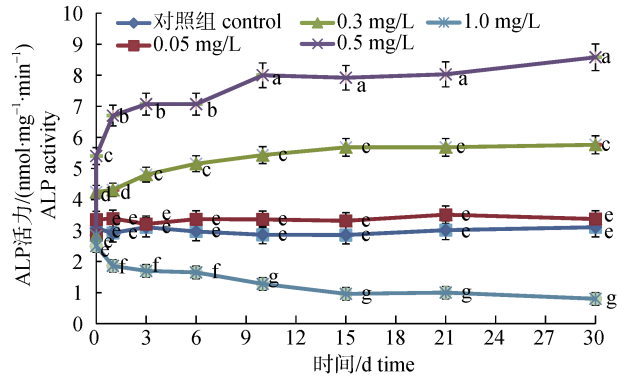


图 2 石油烃对栉孔扇贝鳃丝 ALP 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Effects of petroleum hydrocarbon on ALP activities of gills  
Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

油烃和 ALP 活力存在明显的剂量效应关系, 鳃丝 ALP 活力显著升高 ( $P < 0.05$ ), 1.00 mg/L 处理组鳃丝 ALP 活力在各个时间点都显著低于对照组的水平 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 各浓度石油烃对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 SOD 活性的影响

图 3 显示消化盲囊 SOD 活力在 0.05 mg/L 处理组与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组 SOD 活力显著被激活 ( $P < 0.05$ ), 15 d 之前存在一定的剂量效应和时间效应关系, 21 d 后, 0.50 mg/L 处理组 SOD 活力开始下降, 1.00 mg/L 处理组 SOD 活力在 1 d 左右达到最高值, 在 21 d 后明显被抑制 ( $P < 0.05$ ); 图 4 显示, 鳃丝 SOD 活力与消化盲囊的变化趋势有相似之处, 不同点在于 0.50 mg/L 处理组鳃丝 SOD 活力从 15 d 开始就低于 0.30 mg/L 处理组, 下降趋势更明显, 而 1.00 mg/L 高浓度组 SOD 活力在 0.5 d 左右达到最高值, 随后从第 3 天开始就明显被抑制 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各浓度石油烃对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 GPx 活性的影响

图 5 显示, 0.05 mg/L 处理组消化盲囊 GPx 酶活力与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组 GPx 活力都明显被激活 ( $P < 0.05$ ), 且存在剂量-效应和时间-效应关系, 而 1.00 mg/L

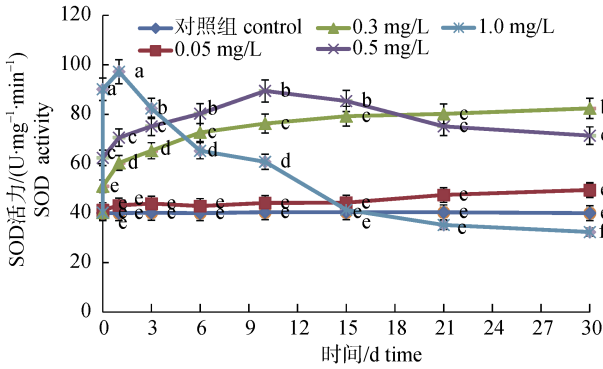


图 3 石油烃对栉孔扇贝消化盲囊 SOD 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 3 Effects of petroleum hydrocarbon on SOD activities of digestive gland

Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

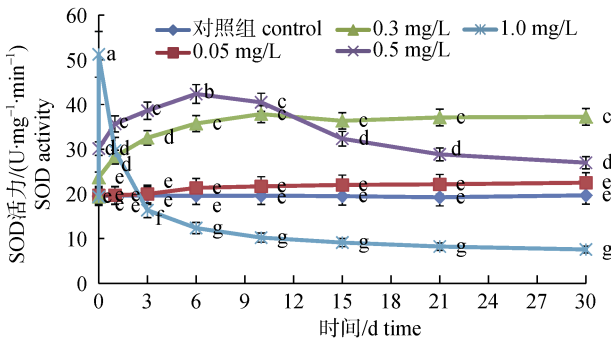


图 4 石油烃对栉孔扇贝鳃 SOD 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 4 Effects of petroleum hydrocarbon on ALP activities of gills  
Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

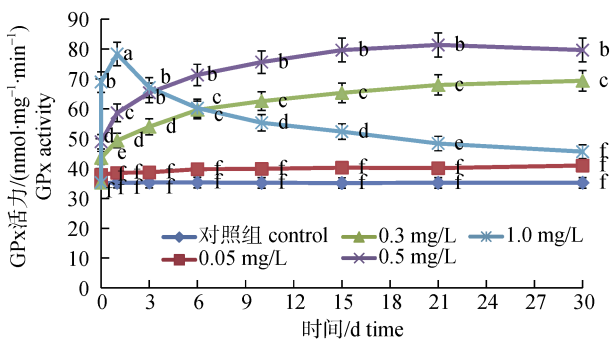


图 5 石油烃对栉孔扇贝消化盲囊 GPx 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 5 Effects of petroleum hydrocarbon on GPx activities of digestive gland

Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

处理组在 1 d 左右 GPx 活力达到最高值, 随后开始下降并接近于对照组水平; 图 6 显示鳃丝 GPx 活力在 0.05 mg/L 处理组与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组与对照组相比明显升高 ( $P < 0.05$ ), 两个浓度组在 6 d 左右达到最高值, 随后接近于对照组水平, 剂量效应关系在 6 d 之前特征明显, 而 6 d 之后 0.50 mg/L 处理组 GPx 活力开始下降, 并在最后阶段接近对照组水平, 1.00 mg/L 浓度组 GPx 活力在 3 d 之前显著被激活 ( $P < 0.05$ ), 在 0.5~1 d 之间达到最高值, 在 6 d 之后显著被抑制 ( $P < 0.05$ )。

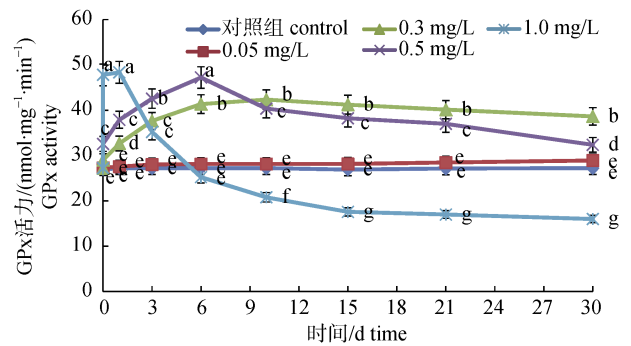


图 6 石油烃对栉孔扇贝鳃丝 GPx 活力的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 6 Effects of petroleum hydrocarbon on GPx activities of gills  
Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

## 2.4 石油烃对栉孔扇贝血细胞膜稳定性的影响

从图 7 可以看出, 0.05 mg/L 处理组血细胞稳定性跟对照组相比无变化 ( $P > 0.05$ ), 而 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组稳定性分别从 6 d 和 3 d 后明显低于对照组的水平 ( $P < 0.05$ ), 1.00 mg/L 高浓度处理组在各测定点都明显低于对照组的水平 ( $P < 0.05$ ), 细胞膜稳定性与暴露时间、石油烃浓度存在明显的负相关关系, 浓度越高, 时间越长, 细胞膜稳定性越低。

## 3 讨论

### 3.1 石油烃对栉孔扇贝抗氧化酶的影响特点探讨

已有研究表明某些有机污染物例如多环芳烃 (PAHs) 和多氯联苯 (aroclor) 可以对水生生物免疫

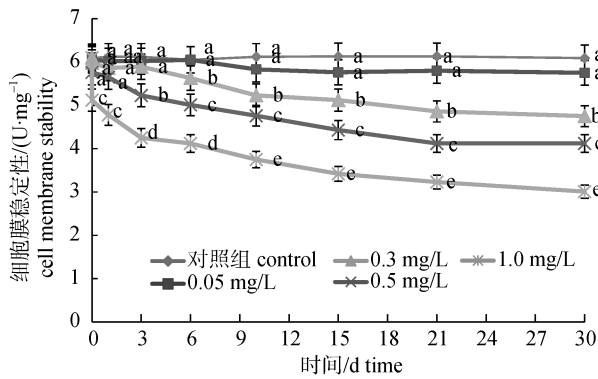


图 7 石油烃对栉孔扇贝血淋巴细胞膜稳定性的影响  
各时间点的不同字母表示其差异显著( $P < 0.05$ ).

Fig. 7 Effects of petroleum hydrocarbon on cell membrane stability of haemocytes

Values with different letters mean significant differences ( $P < 0.05$ ).

功能产生影响, 相关免疫指标在污染物影响下会发生不同程度的变化<sup>[11, 21-22]</sup>, 污染物进入生物机体后随着生物转化会产生较多的一级代谢物例如活性氧<sup>[23]</sup>, 导致抗氧化酶为代表的免疫指标活性升高或者降低。另有研究表明, 贻贝体内 SOD、CAT 和 GPx 活力在低浓度多氯联苯化合物, 多环芳烃和石油污染影响下会升高<sup>[24]</sup>, 这与本实验中 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 石油烃处理组 GPx 和 SOD 活力均呈现被激活的现象一致; 除 0.50 mg/L 处理组消化盲囊 GPx 活力在 21 d 之后仍然高于 0.30 mg/L 处理组之外, 其余 SOD 和 GPx 活力都在 21 d 之后呈现下降现象, 并低于 0.30 mg/L 处理组, 且本实验中鳃丝和消化盲囊的 SOD 和 GPx 活力变化趋势并不完全相同, 0.50 mg/L 消化盲囊和鳃丝 SOD 活力分别在 21 d 和 15 d 低于了 0.30 mg/L 的水平, 鳃丝酶活力下降速度较快, 且消化盲囊 GPx 活力并未呈现低于 0.30 mg/L 处理组的情况, 这说明鳃丝受 0.50 mg/L 浓度石油烃影响所呈现的变化更为敏感; 有较多的研究表明抗氧化酶活力在高浓度污染物影响下会呈现先升高后降低的趋势<sup>[7-8, 22, 25]</sup>, 本实验中 1.00 mg/L 处理组除消化盲囊 GPx 活力最终阶段未明显低于对照组之外, 其余酶活力均呈现先升高最后被抑制的状态, 这与以上研究结果相似, 且本实验中消化盲囊和鳃丝 SOD 活力分别第 21 天和第 3 天低于了对照组水平, 鳃丝在最后

阶段被抑制的程度较为明显, 这说明不同浓度石油烃对栉孔扇贝抗氧化酶的影响具有一定的剂量-效应关系, 且鳃丝受高浓度石油烃影响的程度较大, 本实验中鳃丝受到氧化损伤的程度较消化盲囊明显, 这与鳃丝和污染物接触相对开放且解毒功能相对较低具有一定的关系<sup>[8, 25]</sup>。扇贝抗氧化系统在实验时间内能抵御低于 0.30 mg/L 石油烃水平带来的影响, 此时抗氧化酶活力升高, 可以消除低浓度石油烃所产生的活性氧等一级代谢物, 而 0.50 mg/L 以上浓度处理组最后阶段, 抗氧化酶活力的下降, 意味着机体对 SOD 和 GPx 活力升高具有一定的限度, 不能继续提高自身的抗氧化酶活力, 此时机体产生的活性氧等有害物质增多, 反作用于 SOD 和 GPx 酶而导致机体受氧化损伤程度加大, 在 1.00 mg/L 处理组, 两组织 SOD 和鳃丝 GPx 活力最终阶段都显著低于对照组水平, 机体则处于更为严重的氧化损伤状态之中, 而此浓度下消化盲囊 GPx 活力最后阶段未明显低于对照组, 从 SOD 和 GPx 活力在相同时间下, 相同组织的抑制程度看, GPx 受抑制的程度相对较弱, 这在一定程度上可以说明在机体免疫的最后阶段 GPx 可以承担更多的抗氧化任务, 可能这与两种酶具体的作用机制有一定关系, 尚待进一步的研究。

### 3.2 石油烃对栉孔扇贝组织 ALP 活性的影响

碱性磷酸酶作为水产动物的一种重要的代谢调控酶, 与软体动物壳角蛋白质的合成具有一定关系<sup>[26]</sup>, 其为溶酶体酶重要的组成部分, 在免疫应答中起到一定的作用。有研究表明, 碱性磷酸酶在贝类消化盲囊中的活性高于其他组织, 且在污染物的影响下具有明显的变化<sup>[27]</sup>。本实验也测定出对照组消化盲囊的 ALP 活性比鳃丝高, 两种组织在石油烃影响下, 变化情况有所不同, 0.30 mg/L 处理组和 0.50 mg/L 处理组的 ALP 活性在两种组织都明显被激活, 其中消化盲囊的 ALP 活性从第 3 天开始趋于稳定, 而鳃丝 ALP 活性在实验整个阶段不断升高, 说明虽然鳃丝 ALP 活性整体偏低, 但在石油烃影响下被激活的幅度较消化盲囊高; 已经有学者研究发现一定浓度 PAHs 可以显著抑制双壳贝类

鳃丝的 ALP 活力<sup>[28]</sup>, 这与本实验 1.00 mg/L 处理组中, 鳃丝 ALP 活性一直被抑制的结果相似, 但是消化盲囊呈现先被激活然后迅速被抑制的特点, 说明栉孔扇贝鳃丝 ALP 活性变化相对于消化盲囊更明显, 对石油烃污染反应更敏感, 所以很多研究也将其作为免疫指标来监测污染物<sup>[29]</sup>, ALP 活力的抑制很可能归咎于在高浓度石油烃影响下以活性氧为代表的氧化物质攻击 ALP 酶半胱氨酸蛋白组的巯基导致的<sup>[30]</sup>。整体来看, 高浓度处理组对栉孔扇贝以 ALP 为代表的免疫指标具有明显的抑制作用, 会导致其免疫能力的下降。本实验中两组织 ALP 活力、SOD 活力和 GPx 活力在 0.05 mg/L 处理组均无明显变化, 在 0.30 mg/L 和 0.50 mg/L 处理组均被明显激活, 而在 1.00 mg/L 处理组均呈现快速被激活然后下降的趋势, 除消化盲囊 GPx 活力最终高于对照组之外, 其余活力在最后阶段都显著低于对照组水平, 各指标的变化趋势具有一定的相似性, 说明三者 in 解毒石油烃的过程中具有一定的联系, 具体需进一步研究确定。

### 3.3 石油烃对栉孔扇贝血细胞膜稳定性的影响

细胞膜稳定性在对于整个细胞活动过程的维护和运行非常重要, 有研究发现细胞膜稳定性可以被有机污染物例如多环芳烃 PAHs 所降低<sup>[31]</sup>。双壳贝类的溶酶体可以吸收、积累和代谢一定浓度的外源性化合物<sup>[32]</sup>。然而, 在外源性化合物浓度较高, 有害代谢物积累量增大到一定程度时, 在污染物代谢过程中会积累大量的活性氧 ROS, 这种解毒能力就会大大降低, 产生脂质过氧化, 会导致细胞膜的损伤<sup>[33-34]</sup>。也有实验表明, 细胞膜稳定性与细胞中溶酶体的体积成反比, 这一点在海洋双壳类的研究中有所表现<sup>[35]</sup>。本研究中高浓度处理组中性红染色时滞留的面积和体积都相对明显, 这与细胞膜稳定性降低、溶酶体体积增大具有一定的关系。本研究结果显示, 低浓度处理组细胞膜稳定无太大变化, 但是 0.30 mg/L 及以上浓度处理组在第 3 天之后明显降低, 0.30 mg/L、0.50 mg/L 和 1.00 mg/L 处理组在实验最后阶段分别比对照组降低了 22%、32%和 50%。结合本研

究中抗氧化酶的变化趋势来看, 高浓度组的抗氧化酶活力在实验的最后阶段被抑制比较明显, 说明机体受到的氧化损伤程度较大, 所以本研究中高浓度细胞膜稳定性大幅度降低与此有较大关系。本研究中, 抗氧化酶、碱性磷酸酶活性和细胞稳定性的变化较为明显, 其激活或抑制程度与石油烃浓度以及作用时间有关, 能在一定程度上反映石油烃暴露对栉孔扇贝的毒性效应, 可以尝试试用作评价海洋石油烃污染程度的生物监测指标。

### 参考文献:

- [1] Li J, Gong X H, Qiao D, et al. Review of the impact of oil pollution on the food security of marine shellfish[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2015, 5(1): 34-41. [李静, 宫向红, 乔丹, 等. 石油污染对海洋贝类食品安全性影响研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(1): 34-41.]
- [2] Li Y P, Wang C J, Ha M D. Cause analysis and control measures for marine oil pollution[J]. Science & Technology Information, 2014(5): 39-41. [李银朋, 王长进, 哈明达. 海洋石油污染的原因分析及防治措施[J]. 科技咨询, 2014 (5): 39-41.]
- [3] Tian L F, Ren Z, Cui Y, et al. Acute toxicity of Shengli crude oil and its impact on AKP activity of *Paralichthys olivaceus*[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(6): 95-100. [田丽粉, 任仲, 崔毅, 等. 胜利原油对褐牙鲆稚鱼的急性毒性和幼鱼碱性磷酸酶的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(6): 95-100.]
- [4] Lü F R, Xiong D Q. Toxicity effects of oil and dispersant on sea urchin (*Hemicentrotus pulcherrimus*)[J]. Journal of East China Normal University: Natural Science, 2009(3): 7-16. [吕福荣, 熊德琪. 溢油分散剂对马粪海胆(*Hemicentrotus pulcherrimus*)污染效应的影响[J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2009(3): 7-16.]
- [5] Auffret M, Rousseau S, Boutet I, et al. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean[J]. Ecotox Environ Safe, 2006, 63(3): 393-405.
- [6] Ren J Y, Li S F. Effects of polychlorinated biphenyls 1254 (PCB<sub>1254</sub>) on two enzyme activity of biotransformation in digestive gland and gills of scallop *Chlamys farreri*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(2): 342-346. [任加云, 李树峰. 多氯联苯(PCB<sub>1254</sub>)对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 EROD、GST 酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(2): 342-346.]
- [7] Nie Z J, Xu G C, Zhang S L, et al. Acute effects of copper on

- survival of fingerlings, antioxidant enzyme activities in liver and structure of gill and liver of *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 161–168. [聂志娟, 徐钢春, 张守领, 等. 铜对刀鲚幼鱼的急性毒性及对肝抗氧化酶活性与组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 161–168.]
- [8] Ren J Y, Liu J J, Yu X, et al. Responses of antioxidant systems and lipid peroxidation levels to PCB<sub>1254</sub> in the two tissues of the scallop *Chlamys farreri*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2011(3): 149–156. [任加云, 刘娟娟, 于祥, 等. 多氯联苯(PCB<sub>1254</sub>)对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝抗氧化系统及脂质过氧化水平的影响[J]. 海洋湖沼通报, 2011(3): 149–156.]
- [9] Luengen A C, Friedman C S, Raimondi P T, et al. Evaluation of mussel immune responses as indicators of contamination in San Francisco Bay[J]. Mar Environ Res, 2004, 57(3): 197–212.
- [10] Cartier S, Pellerin J, Fournier M, et al. Use of an index based on the blue mussel (*Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus*) digestive gland weight to assess the nutritional quality of mussel farm sites[J]. Aquaculture, 2004, 241(1–4): 633–654.
- [11] Ordás M C, Albaigés J, Bayona J M, et al. Assessment of *in vivo* effects of the prestige fuel oil spill on the Mediterranean mussel immune system[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2007, 52(2): 200–206.
- [12] Liang A P, Ma Z H, Jiang X M, et al. Accumulation of petroleum hydrocarbon in *Chlamys farreri* exposed to combined pollutants[J]. Journal of Yantai University: Natural Science and Engineering Edition, 2012, 25(3): 222–227. [梁爱萍, 马兆虎, 姜雪梅, 等. 复合污染条件下石油烃在扇贝体内的积累状况[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2012, 25(3): 222–227.]
- [13] Zhao M L. Preliminary study on response of *Chlamys farreri* to petroleum hydrocarbon accumulation[D]. Qingdao: The First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, 2011: 1–12. [赵美丽. 栉孔扇贝对石油烃蓄积及响应的初步研究[D]. 青岛: 国家海洋局第一海洋研究所, 2011: 1–12.]
- [14] GB 3097—1997, Sea water quality standard[S]. Beijing: Standards Press of China, 1997. [GB 3097—1997, 海水水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.]
- [15] GB 17378.4—2007, The specification for marine monitoring—Part 4: Seawater analysis[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. [GB 17378.4—2007, 海洋监测规范—第 4 部分: 海水分析[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.]
- [16] Principato G B, Aisa M C, Talesa V, et al. Characterization of the soluble alkaline phosphatase from hepatopancreas of *Squilla mantis* L.[J]. Comp Biochem Physiol B: Comp Biochem, 1985, 80(4): 801–804.
- [17] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, 47(3): 469–474.
- [18] Deng X H, Huang X M, Li W D, et al. The modified DTNB colorimetric method for GSH-Px activity of serum determination[J]. Chongqing Medical Journal, 2000, 29(5): 445. [邓修惠, 黄学梅, 李伟道, 等. 改良 DTNB 比色法测定血清 GSH-Px 活力[J]. 重庆医学, 2000, 29(5): 445.]
- [19] Babich H, Borenfreund E. Neutral red assay for toxicology in vitro[M]//Watson R R (Ed.). In Vitro Methods of Toxicology. Boca Raton: CRC Press, 1992: 39–66.
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1–2): 248–254.
- [21] Francioni E, Wagener A de L R, Scofield A L, et al. Evaluation of the mussel *Perna perna* as a biomonitor of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and effects[J]. Mar Pollut Bull, 2007, 54(3): 329–338.
- [22] Peng L, Zeng J N, Huang W, et al. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in *Mytilus coruscus*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(3): 718–726. [彭玲, 曾江宁, 黄伟, 等. 厚壳贻贝抗氧化酶活性和脂质过氧化物含量对 Cd 和 Aroclor 1254 胁迫的相应[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 718–726.]
- [23] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. Aquat Toxicol, 1991, 19(2): 137–161.
- [24] Solé M, Porte C, Albaigés J. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens[J]. Aquat Toxicol, 1994, 30(3): 271–283.
- [25] Pan L Q, Ren J Y, Liu J. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo(a)pyrene and benzo(k)fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys farreri*[J]. Environ Pollut, 2006, 141(3): 443–451.
- [26] Wootton E C, Dyrinda E A, Ratcliffe N A. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15(3): 195–210.
- [27] Chandurvelan R, Marsden I D, Gaw S, et al. Biochemical biomarker responses of green-lipped mussel, *Perna canaliculus*, to acute and subchronic waterborne cadmium toxicity[J]. Aquat Toxicol, 2013, 140–141: 303–313.



- [28] Grintzalis K, Georgiou C D, Dailianis S. Total thiol redox status as a potent biomarker of PAH-mediated effects on mussels[J]. *Mar Environ Res*, 2012, 81: 26–34.
- [29] Regoli F, Principato G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers[J]. *Aquat Toxicol*, 1995, 31(2): 143–164.
- [30] Atli G, Canli M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*[J]. *Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol*, 2007, 145(2): 282–287.
- [31] French-McCay D P. Oil spill impact modelling: Development and validation[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23(10): 2441–2456.
- [32] Hagger J A, Depledge M H, Galloway, T S. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*[J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, 51(8–12): 811–816.
- [33] Winston G W, Moore M N, Kirchin M A, et al. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics[J]. *Comp Biochem Physiol C: Pharmacol Toxicol Endocrinol*, 1996, 113(2): 221–229.
- [34] Gómez-Mendikute A, Cajaraville M P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[*a*]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2003, 17(5–6): 539–546.
- [35] Da Ros L, Moschino V, Guerzoni S, et al. Lysosomal responses and metallothionein induction in the blue mussel *Mytilus edulis* from the south-west coast of Iceland[J]. *Environ Int*, 2007, 33(3): 362–369.

## Effect of oil exposure on immune enzyme activity and hemocyte membrane stability in scallop, *Chlamys farreri*

REN Jiayun<sup>1</sup>, MIAO Jingjing<sup>2</sup>, LI Xueping<sup>1</sup>

1. Department of Urban and Environment, Binzhou University of China, Binzhou 256600, China;

2. Department of Aquaculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

**Abstract:** The petroleum hydrocarbon concentrations in seawater were 0.05 mg/L, 0.30 mg/L, 0.50 mg/L, and 1.00 mg/L separately. Three replicates were designed for each treatment. The experimental period for the scallop, *Chlamys farreri*, was 30 days. Sampling occurred at hours 0 and 12 and days 1, 3, 6, 10, 15, 21, and 30. The gills, digestive gland, and hemocytes were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and were evaluated within 24 h. The results showed that none of the biomarkers changed significantly in the 0.05 mg/L group. Alkaline phosphatase (ALP), superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities increased significantly in the gills and digestive glands of the 0.30 mg/L and 0.50 mg/L groups ( $P < 0.05$ ), whereas these activities were similar to or lower than control levels in the 1.00 mg/L group. Biomarkers in the gills changed more significantly than those of the digestive gland. Hemocyte membrane stability did not change significantly in the 0.05 mg/L group but was lower than that in the controls and other groups later in the experiment ( $P < 0.05$ ). Hemocyte stability was lower in the groups exposed to higher petroleum hydrocarbon concentrations. These results suggest that *C. farreri* can detoxify low concentrations of petroleum hydrocarbon, such as 0.05 mg/L. No effect on hemocyte stability was observed over the short term in the 0.30 mg/L and 0.50 mg/L groups, but oxidative damage occurred later in the experiment, which decreased membrane stability. The *C. farreri* biomarkers changed significantly in the 1.00 mg/L petroleum hydrocarbon concentration group and oxidative damage to the gills increased and hemocyte membrane stability decreased substantially after 3 d. Antioxidant and ALP activities changed significantly in the gills compared to those in the digestive gland at the same petroleum hydrocarbon concentration, so the gills were more sensitive to petroleum hydrocarbon than the digestive gland. The changes in the biomarkers showed dose- and time-effect characteristics; thus, these biomarkers may be useful to evaluate oceanic oil pollution.

**Key words:** petroleum hydrocarbon; *Chlamys farreri*; antioxidase; alkaline phosphatase; cell membrane stability

**Corresponding author:** REN Jiayun. E-mail: renjiayun@163.com